



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21), (22) Заявка: **2008148003/15, 05.12.2008**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.12.2008(45) Опубликовано: **27.01.2010** Бюл. № 3(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **RU 2012888 C1, 15.05.1994. RU 2177617 C1,
27.12.2001. RU 2182599 C1, 10.11.2000. RU
2130615 C1, 18.05.1998.**

Адрес для переписки:

**117571, Москва, пр-кт Вернадского, 86,
МИТХТ, отдел защиты интеллектуальной
собственности**

(72) Автор(ы):

**Станишевский Ярослав Михайлович (RU),
Грицкова Инесса Александровна (RU),
Прокопов Николай Иванович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования "Московская государственная
академия тонкой химической технологии
имени М.В. Ломоносова" (RU)**

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ
РЕАКЦИИ ЛАТЕКСНОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биомедицинских технологий, в частности к способу получения антительной тест-системы на основе полимерных микросфер - носителей биолигандов (протеин А, специфический иммуноглобулин G) для выявления антигенов: *Yersinia enterocolitica* серотип O3, *Leptospira canicola*, *Salmonella pulorum*, вируса инфекционного бронхита кур (ИБК) штамм Н1 20. Способ получения антительной тест-системы заключается в том, что смешивают в равных объемах физиологический раствор, содержащий протеина А (штамма *Staphylococcus aureus*), и полимерные

микросферы 0,5%-ной полимерной суспензии. Смесь помещают в термостат при +36-38°C, отмывают полимерную суспензию, осадок смешивают с физиологическим раствором, содержащим специфические IgG к одному из антигенов. Полученную смесь выдерживают в термостате при +36-38°C, отмывают полимерную суспензию, осадок смешивают физиологическим раствором, содержащим альбумин. Использование способа позволяет получить тест-системы с высокой чувствительностью реакции латексной агглютинации при выявлении антигенов *Yersinia enterocolitica*, *Leptospira canicola*, *Salmonella pulorum*, вируса ИБК.

RU 2 380 708 C1

RU 2 380 708 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21), (22) Application: **2008148003/15, 05.12.2008**(24) Effective date for property rights:
05.12.2008(45) Date of publication: **27.01.2010 Bull. 3**

Mail address:

**117571, Moskva, pr-kt Vernadskogo, 86, MITKhT,
otdel zashchity intellektual'noj sobstvennosti**

(72) Inventor(s):

**Stanishevskij Jaroslav Mikhajlovich (RU),
Gritskova Inessa Aleksandrovna (RU),
Prokopov Nikolaj Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
vysshego professional'nogo obrazovanija
"Moskovskaja gosudarstvennaja akademija tonkoj
khimicheskoy tekhnologii imeni M.V.
Lomonosova" (RU)****(54) METHOD FOR MAKING ANTIBODY TEST SYSTEM FOR LATEX FIXATION TEST**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns method for making an antibody test system based on polymer microspheres - bioligand carriers (protein A, specific immunoglobulin G) for detecting antigens: *Yersinia enterocolitica* serotype 03, *Leptospira canicola*, *Salmonella pulorum*, virus of avian infectious bronchitis (AIB) strain H120. Method for making the antibody test system consists in mixing equal volumes of physiologic saline containing protein A (strain *Staphylococcus aureus*) and polymer microspheres of 0.5% polymer suspension. The mixture is placed in a thermostat

at +36-38°C. The polymer suspension is washed, and the deposit is mixed with physiologic saline containing specific IgG to one of antigens. The prepared mixture is kept in the thermostat at +36-38°C. The polymer suspension is washed, while the deposit is mixed with physiologic saline containing albumin.

EFFECT: application of the method allows making the high-sensitive test system for latex fixation test in detecting antigens of *Yersinia enterocolitica*, *Leptospira canicola*, *Salmonella pulorum*, and AIB virus.

4 ex

Изобретение относится к области биомедицинских технологий, в частности к способу получения антительной тест-системы на основе полимерных микросфер - носителей биолигандов для выявления антигенов: *Leptospira canicola*, *Yersinia enterocolitica* серотип ОЗ, *Salmonella pulorum*, вирус инфекционного бронхита кур (ИБК) штамм Н120 для постановки реакции латексной агглютинации (РЛА).

Известен способ получения антительной тест-системы для постановки реакции латексной агглютинации, включающий использование частиц, содержащих на поверхности карбоксильные группы, активированные карбодимидом, к поверхности которых иммобилизуют специфический IgG к лептоспирам серогрупп *Canicola* и *Icterohaemorrhagiae* с ультразвуковой обработкой $3 \pm 0,5$ мин и инкубацией при температуре 4°C, отмывкой дистиллированной водой, центрифугированием и добавлением физиологического раствора до первоначального объема [Патент РФ 2177617, кл. G01N 33/567 от 2001.12.27].

Однако такой способ иммобилизации антиглобулиновыми сыворотками обеспечивает случайную ориентацию специфических IgG на поверхность полимерных микросфер.

При случайной иммобилизации IgG на поверхность полимерных микросфер активные центры IgG могут оказаться недоступными для взаимодействия с детерминантными участками антигена, что приведет к ухудшению чувствительности реакции латексной агглютинации (РЛА).

Если же молекула специфического IgG фиксирована на поверхности полимерного носителя Fc-фрагментом, а Fab-фрагмент, несущий активные центры, оказывается ориентирован "наружу", то вероятность взаимодействия с детектируемым участком антигена значительно увеличится, что скажется на улучшении чувствительности реакции латексной агглютинации.

Наиболее близким техническим решением по технической сущности и достигаемому результату к предлагаемому изобретению является способ получения антительной тест-системы для постановки реакции латексной агглютинации, включающий иммобилизацию антиглобулиновых сывороток, содержащих специфические IgG, к различным заболеваниям на частицы полиакрилового латекса с последующим выдерживанием в течение 4 ч при комнатной температуре, pH 7,0-7,4 и 12 ч при 4°C при постоянном равномерном перемешивании [Патент РФ 2012888, кл. G01N 33/531 от 1994.05.15].

Однако такой способ имеет недостаточно высокую чувствительность реакции латексной агглютинации при выявлении антигенов.

Технический результат изобретения - получение антительной тест-системы с высокой чувствительностью реакции латексной агглютинации при выявлении антигенов различной природы: *Leptospira canicola*, *Yersinia enterocolitica* серотип ОЗ, *Salmonella pulorum*, вирус инфекционного бронхита кур (ИБК) штамм Н120.

Указанный технический результат достигается за счет того, что в предложенном способе необходимо к поверхности полимерных микросфер иммобилизовать протеин А (штамма *Staphylococcus aureus*), выполняющий роль спейсера, а затем через него присоединить специфический IgG.

Для этого смешивают в равных объемах (по 1 мл) физиологический раствор, содержащий протеина А (штамма *Staphylococcus aureus*) в концентрации 0,05 мг/мл, и полимерные микросферы 0,5%-ной полимерной суспензии, помещают в термостат при +36-38°C на 4-6 час (процесс иммобилизации). После иммобилизации отмывают полимерную суспензию на центрифуге три раза по 15 минут при 4000 об/мин. Осадок

смешивают с 1 мл антиглобулиновой сыворотки, помещают в термостат при +36-38°C на 4-6 час (процесс иммобилизации). После иммобилизации отмывают полимерную суспензию на центрифуге три раза по 15 минут при 4000 об/мин. Осадок смешивают с 1 мл физиологического раствора, содержащего альбумин 0,07-0,15%.

5 Температурные режимы +36-38°C установили исходя из оптимальной температуры для белков, при которых не происходит их денатурации.

Установлено, что в течение 4 часов при температуре 37°C с поверхностью полимерных микросфер связывалось 80% белка от исходного количества белка в растворе. Дальнейшая экспозиция не приводит к увеличению количества связанного белка, что обусловлено отсутствием свободной поверхности полимерных микросфер.

Полученная антительная тест-система для выявления антигена используется в постановке реакции латексной агглютинации (РЛА) по стандартной методике.

Примеры.

15 Пример 1.

Смешивают в равных объемах (по 1 мл) физиологический раствор, содержащий протеина А (штамма *Staphylococcus aureus*) в концентрации 0,05 мг/мл, и полимерные микросферы 0,5%-ной полимерной суспензии, помещают в термостат при +36-38°C на 4-6 час (процесс иммобилизации). После иммобилизации отмывают полимерную суспензию на центрифуге три раза по 15 минут при 4000 об/мин. Осадок смешивают с 1 мл антиглобулиновой сыворотки, содержащей специфические IgG к *L. Canicola*, помещают в термостат при +36-38°C на 4-6 час (процесс иммобилизации). После иммобилизации отмывают полимерную суспензию на центрифуге три раза по 15 минут при 4000 об/мин. Осадок смешивают с 1 мл физиологического раствора, содержащего альбумин 0,07-0,15%.

Полученную антительную тест-систему для выявления антигена *L. Canicola* используют в постановке реакции латексной агглютинации (РЛА) по стандартной методике.

30 Выявляемая минимальная концентрация антигена *L. canicola*, полученная антительной тест-системой в РЛА, составила 4296 кл/мл.

Пример 2.

35 Антительную тест-систему для выявления антигена *Y. Enterocolitica* готовили, как в примере 1, но в качестве иммобилизации антиглобулиновой сыворотки, содержащей IgG к *L. Canicola* на поверхность полимерных микросфер, иммобилизовали антиглобулиновую сыворотку, содержащую специфические IgG к *Y. Enterocolitica*.

40 Антительную тест-систему для выявления антигена *Y. Enterocolitica* используют в постановке реакции латексной агглютинации (РЛА) по стандартной методике.

Выявляемая минимальная концентрация антигена *Y. Enterocolitica*, полученная антительной тест-системой в РЛА, составила 0,061 мкг/мл.

Пример 3.

45 Антительную тест-систему для выявления антигена *S. pulorum* готовили, как в примере 1, но в качестве иммобилизации антиглобулиновой сыворотки, содержащей IgG к *L. Canicola* на поверхность полимерных микросфер, иммобилизовали антиглобулиновую сыворотку, содержащую IgG к *S. Pulorum*.

50 Антительную тест-систему для выявления антигена *S. pulorum* используют в постановке реакции латексной агглютинации (РЛА) по стандартной методике.

Выявляемые минимальные концентрации антигена *S. pulorum*, полученные антительной тест-системой в РЛА, составили: для *S. Pulorum* фракция О-антигена с

молекулярной массой антигена 300 кД - 1,09 мкг/мл; для *S. Pulozum* фракция О-антигена с молекулярной массой антигена 100-300 кД - 1,95 мкг/мл; для *S. Pulozum* фракция О-антигена с молекулярной массой антигена 30-100 кД - 0,02 мкг/мл.

Пример 4.

5 Антительную тест-систему для выявления антигена вируса инфекционного бронхита кур (ИБК) штамм Н120 готовили, как в примере 1, но в качестве иммобилизации антиглобулиновой сыворотки, содержащей IgG к *L. Canicola* на поверхность полимерных микросфер, иммобилизовали антиглобулиновую сыворотку,
10 содержащую IgG к вирусу ИБК штамм Н120.

Антительную тест-систему для выявления антигена вируса ИБК штамм Н120 используют в постановке реакции латексной агглютинации (РЛА) по стандартной методике.

15 Выявляемая минимальная концентрация антигена вируса ИБК штамм Н120, полученная антительной тест-системой в РЛА, составила 10^5 ЭИД/₅₀ (эмбриональная инфекционная доза).

Предлагаемый способ получения антительной тест-системы увеличит чувствительность реакции латексной агглютинации (РЛА) при выявлении антигенов
20 различной природы: *Leptospira canicola*, *Yersinia enterocolitica* серотип О3, *Salmonella pulozum*, вирус инфекционного бронхита кур (ИБК).

Антительные тест-системы найдут применение в медицине и ветеринарии при выявлении антигенов потенциальных возбудителей заболеваний, что позволит
25 принять соответствующие меры лечения и профилактики.

Формула изобретения

Способ получения антительной тест-системы для постановки реакции латексной агглютинации, отличающийся тем, что проводят иммобилизацию протеина А
30 штамма *Staphylococcus aureus* в концентрации 0,05 мг/мл на поверхность окрашенных полимерных микросфер с диаметром частиц 1,2 мкм, представляющих собой сополимер стирола, акролеина, стиролсульфоната натрия, в физиологическом растворе при температуре 36-38°C в течение 4-6 ч, причем концентрация полимерных
35 частиц в полимерной суспензии составляет 0,5% по сухому остатку полимера, далее отмывают полимерную суспензию на центрифуге три раза по 15 мин при 4000 об./мин, осадок смешивают с антиглобулиновой сывороткой, которая содержит специфические иммуноглобулины, выдерживают при 36-38°C 4-6 ч, отмывают полимерную суспензию на центрифуге три раза по 15 мин при 4000 об./мин, осадок смешивают с
40 0,07-0,15%-ным физиологическим раствором альбумина.

45

50